Y 染色体微缺失快速检测系统说明书　25人份/盒

● 概述

本试剂盒用于快速检测人（男性）Y 染色体 AZF 座位（Azoospermia Factor）的缺失。多项研究发现，AZF 基因家族共有 AZFa、AZFb、AZFc 三个座位（在 AZFb 与 AZFc 之间还存在 AZFd 座位，中等程度的少精和精子数目正常却形态异常多会与该区域的缺失有关），其中任何一个座位的微缺失都可导致生精障碍。本试剂盒共设计 15 对引物和一对内控（内部质量控制）引物，利用 PCR（Polymerase Chain Reaction）技术可从 Y 染色体上特异性扩增出 15 条非多态性短片段的序列标签位点（Sequence Tagged Sites，STS）和一条内控基因片段。这些引物对分别组合成 4 套多重 PCR 系统，在相同条件下，进行 4 管 PCR 扩增反应，通过电泳结果判定 15 个序列标签位点（STS）的存在与否。

主要特点：

1. 可对 15 个 STS 序列标签位点进行检测，这 15 个位点覆盖了所有的 AZF 区域，其中 AZFa 有 3 个位点，AZFd 有 2 个，AZFb 有 6 个，AZFc 有 4 个位点；
2. 高特异引物确保结果的可靠性，并具有内控（内部质量控制）基因片断的检测；
3. 独特的防污染设计，有效避免假阳性的产生；
4. 符合并超过欧洲生殖学会推荐的检测标准。

应用： 胞质内单精子注射（ICSI）技术辅助生育治疗前的检测、少精症与无精症男性患者遗传学检测、精子库的入库前筛查等。

● 试剂盒组成

组成成分	数量	保存条件
PCR 反应液Ⅰ（紫色）	25 管 (每管 14μL)	-20℃
PCR 反应液Ⅱ（无色）	25 管 (每管 14μL)	-20℃
PCR 反应液Ⅲ（蓝色）	25 管 (每管 14μL)	-20℃
PCR 反应液Ⅳ（黄色）	25 管 (每管 14μL)	-20℃
纯水	1 管	室温/4℃
矿物油	1 管	室温
正常男性基因组 DNA	40μL	-20℃

● 有效期　六个月

● 需自备的仪器及试剂

PCR 仪（推荐使用 PTC-100 或 PTC-200, M J Research Co.或其它国际知名品牌 PCR 仪）

DNA 电泳系统

● 操作步骤

1. 基因组 DNA 的获取

使用本公司全血 DNA 快速提取试剂盒从抗凝全血中抽提人（男性）基因组 DNA，按操作说明进行。

2. PCR 扩增

取加入了 PCR 反应液Ⅰ，反应液Ⅱ，反应液Ⅲ， 反应液Ⅳ各 14μl PCR 反应管四支，在管壁上做好标记，而后分别加入已提取的样本 gDNA 4μL（含基因组 DNA200-500ng）， 加入无菌水至 25μl 反应总体系。该过程需在冰上操作，且每次检测都应同时设立一组阳性对照（正常男性基因组 DNA）及阴性对照（女性基因组 DNA）。

Ⅰ管		Ⅱ管		Ⅲ管		Ⅳ管	
PCR 反应液Ⅰ	14μL	PCR 反应液Ⅱ	14μL	PCR 反应液Ⅲ	14μL	PCR 反应液Ⅳ	14μL
DNA 模板	4μL (200-500ng)	DNA 模板	4μL (200-500ng)	DNA 模板	4μL (200-500ng)	DNA 模板	4μL (200-500ng)
H_2O	7μL	H_2O	7μL	H_2O	7μL	H_2O	7μL
Total	25μL	Total	25μL	Total	25μL	Total	25μL

按以下条件进行扩增：

50℃	10min	
95℃	15min	
94℃	30s	34 cycles
58℃	60s	
72℃	60s	
72℃	10min	

3. 电泳检测

取 10 μL PCR 产物加 2μL 6×上样缓冲液，（10uLPCR 产物是针对 1mm×3mm 上样孔，可根据上样孔的大小作适当调整）混和均匀后经 2.0%琼脂糖电泳，先用电压 8V/cm 电泳约 3 分钟使 DNA 迁移出上样孔，降低电压至 4v/cm 至溴酚蓝迁移出 2－3 厘米，即可在紫外灯下观察结果，如条带不能充分区分，可继续电泳至能区分为止。凝胶质量对条带的区分十分关键，推荐使用 Promega 或 Biowest 等进口琼脂糖，大多数国产的琼脂糖无法获得理想效果，并建议使用凝胶成像系统。

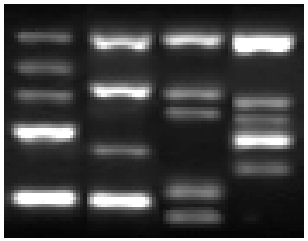
● 结果分析

（1）**阴性对照：** 在未加模板 DNA 的反应管内，应无任何特异性产物扩增

（2）**阳性对照：** 以正常男性基因组 DNA 为模板的反应管内应扩出以下条带：

Ⅰ	片断大小 (bp)	位点	Ⅱ	片断大小 (bp)	位点	Ⅲ	片断大小 (bp)	位点	Ⅳ	片断大小 (bp)	位点
内控	470		内控	470		内控	470		内控	470	
SY254	380	C	SY84	326	A	SY86	320	A	SY134	301	B
SY143	310	B	SY239	200	C	SY127	270	B	SY82	264	A
SY242	230	C	SY152	125	D	SY145	140	D	SY128	228	B
SY255	126	C				SY124	109	B	SY133	177	B

其中男性样品都应扩出内控带。若待测男性样品中无此带，说明其基因组 DNA 未抽提成功，应重新抽提 DNA。



Ⅰ Ⅱ Ⅲ Ⅳ

图： 正常男性 Y 染色体微缺失 PCR 检测结果（暂时未提供缺失样品检测结果）

检测结果记录表

Ⅰ	片断 (bp)	位点	样品 (+/–)	Ⅱ	片断 (bp)	位点	样品 (+/–)	Ⅲ	片断 (bp)	位点	样品 (+/–)	Ⅳ	片断 (bp)	位点	样品 (+/–)
内控	470			内控	470			内控	470			内控	470		
SY254	380	C		SY84	320	A		SY86	320	A		SY134	301	B	
SY143	310	B		SY239	200	C		SY127	270	B		SY82	264	A	
SY242	230	C		SY152	125	D		SY145	140	D		SY128	228	B	
SY255	125	C						SY124	109	B		SY133	177	B	
结果判定：															

● 注意事项

1. 在运输过程中会有 PCR 反应液附着在管壁/盖上，因此请在使用前先离心，以保证 PCR 反应体系的体积及潜在的污染。
2. PCR 反应使用的吸头应高压灭菌并一次性使用。
3. 每次检测务必设置阴性对照和阳性对照。检测得到正常样品可作为下次实验的阳性对照。

修改日期：2005 年 04 月 20 日

如有不明之处，请致电本公司技术支持！ Email: techsupport@siercheng.com

代理商：北京思尔成生物技术有限公司 生产商：亚能生物

代理商地址：北京经济技术开发区宏达北路10号万源商务中心5001室 邮政编码：100176

电话(免长途费)：400-6501950 传真：010-67880126-602 www.siercheng.com